

氏名	張 本 幸 司
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第3444号
学位授与年月日	平成10年 3 月24日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 論 文 名	非ウイルス・ベクターによる膀胱への <i>in vivo</i> 遺伝子導入法
論文審査委員	主 査 教 授 岸本 武利 副主査 教 授 福島 昭治 副主査 教 授 大谷 周造

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 癌に対する遺伝子治療は、新しい有望な治療法として成績が集積されてきている。遺伝子治療の臨床応用の際に問題となるのが遺伝子の導入法、ベクターの安全性であり、ウイルス・ベクターの安全性は議論的である。そこで膀胱癌を対象とした遺伝子治療を想定し、4通りの非ウイルス・ベクターによる膀胱粘膜への*in vivo*遺伝子導入法を検討した。

【方法】 1. リポフェクション：DOTMA(Syntex)とDOPE(シグマ)との1:1混合物から生成(100 μ g/ml)し、DNA(20 μ g/ml)と1:1でインキュベート後、正常ラットおよびBBN誘発膀胱腫瘍マウスに対してそれぞれ0.2ml, 0.05mlを膀胱内注入した。

2. HVJリボソーム法：センダイ・ウイルス(HVJ)の細胞膜融合能を利用したHVJリボソームを金田らの方法(J Biol Chem 264: 12126, 1989)により作成し、正常ラットおよびBBN処置マウスそれぞれ0.2ml(5-10 μ gDNA), 0.05ml(2 μ gDNA)を膀胱内注入した。

3. 遺伝子銃：高圧窒素ガスを利用したパーティクル・ガン（マッハ・インパクターKPG-10, 関西ペイント社製）を用いて、DNA 1 μ gをコートした直径0.5または1.0 μ mの金粒子1.0mgをウサギ膀胱粘膜に打ち込んだ。

4. 電気穿孔法：ウサギ膀胱粘膜下にDNAを100 μ g注入した後、その両側に5-7mm幅で平行に刺入した針電極間で0.15-0.2A, 50msecのパルス電流を1秒間隔で8回発生させた(Electro Square Porator T820およびOptimizor 500, BTX Inc.)。

マーカー遺伝子としてはpSV- β -gal(Promega)を用い、遺伝子導入後48時間で摘出した膀胱の凍結切片をx-gal染色して β -galの発現を組織学的に検討した。また、発現量の定量ではpCAT(Promega)を用い、CAT活性を測定した。

【結果】 リポフェクションでは一部の上皮表層でのみ β -galの発現が認められた。HVJ-リボソームでは広範囲の表層上皮で β -galの強い発現が認められ、CATの発現は5日目がピークであった。遺伝子銃では標的とした部位に斑状ではあるが、上皮の全層や深層で β -galの強い発現が認められた。電気穿孔法では、電極間の主として粘膜下の間質細胞等で発現が多く認められた。

【考察】 HVJリボソームは上皮内癌タイプの膀胱癌に対して非常に有利な発現様式を有しており、例えば自殺遺伝子等を導入することにより有効な治療手段となる可能性が考えられる。後半の2つの方法は、術前や術中にサイトカイン遺伝子等を導入することにより新しいアジュバント療法になりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

癌に対する遺伝子治療は、新しい有望な治療法として成績が集積されてきている。遺伝子治療の臨床応用の際に問題となるのが遺伝子の導入法、ベクターの安全性である。そこで膀胱癌を対象とした遺伝子治療を想定し、4通りの非ウイルス・ベクターによる膀胱粘膜へのin vivo遺伝子導入法を検討した。

【方法】1. リポフェクション：N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chlorideとdioleoylphosphatidylethanolamineとの1:1混合物から生成(100 μ g/ml)し、DNA(20 μ g/ml)と1:1でインキュベート後、正常ラットおよびN-n-Butyl-N-butan-r-ol-nitrosamine(BBN)誘発膀胱腫瘍マウスに対してそれぞれ0.2ml, 0.05mlを膀胱内注入した。2. hemagglutinating virus of Japan (HVJ)リポソーム法：センダイ・ウイルス(HVJ)の細胞膜融合能を利用したHVJリポソームを金田らの方法により作成し、正常ラットおよびBBN処置マウスそれぞれ0.2ml(5-10 μ gDNA), 0.05ml(2 μ gDNA)を膀胱内注入した。3. 遺伝子銃：高圧窒素ガスを利用したパーティクル・ガンを用いて、DNA1 μ gをコートした直径0.5または1.0 μ mの金粒子1.0mgをウサギ膀胱粘膜に打ち込んだ。4. 電気穿孔法：ウサギ膀胱粘膜下にDNAを100 μ g注入した後、その両側に5-7mm幅で平行に刺入した針電極間で0.15-0.2A, 50msecのパルス電流を1秒間隔で8回発生させた。

マーカー遺伝子としては β -galactosidase(β -gal)を用い、遺伝子導入後48時間で摘出した膀胱の凍結切片を5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside(x-gal)染色して β -galの発現を組織学的に検討した。また、発現量の定量ではchloramphenicol acetyl-transferase(CAT)を用い、CAT活性を測定した。

【結果】リポフェクションでは一部の上皮表層でのみ β -galの発現が認められた。HVJ-リポソームでは広範囲の表層上皮で β -galの強い発現が認められ、CATの発現は5日目ピークであった。遺伝子銃では標的とした部位に斑状ではあるが、上皮の全層や深層で β -galの強い発現が認められた。電気穿孔法では、電極間の主として粘膜下の間質細胞等で発現が多く認められた。

【考察】HVJリポソームは上皮内癌タイプの膀胱癌に対して非常に有利な発現様式を有しており、例えば自殺遺伝子等を導入することにより有効な治療手段となる可能性が考えられる。後半の2つの方法は、術前や術中にサイトカイン遺伝子等を導入することにより新しいアジュバント療法になりうると考えられた。

本研究は、非ウイルス・ベクターによる膀胱での遺伝子発現を確認し、膀胱腫瘍に対する遺伝子治療の臨床応用の可能性に寄与をなすものと考えられた。従って、本研究者は博士(医学)の学位を授与されるに値するものと判定した。